

André Schulze

Dr. med.

## **An open-source microfluidic platform for diffraction-limited fluorescence imaging**

Fach/Einrichtung: DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum)

Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. Michael Knop

Fluorescence activated cell sorting (FACS) ist aktuell das am weitesten verbreitete Verfahren zur fluoreszenzbasierten Zellsortierung. Doch trotz des ubiquitären Einsatzes in Klinik und Forschung, liefert es nur wenig Informationen über sub-zelluläre Strukturen und Organellen. Aktueller Fortschritt der Kamera-Technologie hat zu einer verbesserten räumlichen und zeitlichen Auflösung der Echtzeit-Fluoreszenz-Mikroskopie geführt und ist so zu einem integralen Bestandteil der modernen Biologie des letzten Jahrzehnts geworden. Fluoreszenzmarkierung, zur in vivo Analyse von Proteinen, hat zu einem enormen Anstieg des Wissens über Zellfunktionen geführt. Damit war es eine der treibenden Kräfte zur Etablierung der Fluoreszenzmikroskopie in der molekularen Biologie. Die Analyse von Fluoreszenzbildern erlaubt die direkte Auswertung der Menge, Lokalisierung, Dynamik und Interaktion von Proteinen in Zellen und ermöglicht die Unterscheidung zwischen Zellen, Clustern von Zellen und Zellschrott. Die funktionelle Analyse von biologischen Proben für Diagnostik und Forschung benötigt oft die Isolation von kleinen Zellpopulationen aus heterogenen Mischungen. Das Interesse an bild-basierten Methoden zur Zellseparierung ist daher im letzten Jahrzehnt stark gestiegen. Die vorliegende Arbeit hat die Entwicklung eines open-source Bio-Instruments zur kontinuierlichen Bildaufnahme von Zellen untersucht. Dieses bietet zudem die Möglichkeit zu einem Zellsortierer erweitert zu werden. Der Aufbau des Instruments beinhaltet ein spezialisiertes Mikroskop, einen mikrofluidischen Chip zur Zellfokussierung und Software zur Steuerung der Bildaufnahme, der Bildanalyse und die grafische Benutzeroberfläche. Das speziell angefertigte Mikroskop erlaubt die Aufnahme von einem Durchlichtbild und zwei Fluoreszenz-Kanälen mit einer hohen räumlichen Auflösung. Der drei-dimensionale mikrofluidische Chip stellt sicher, dass Zellen nah am Objektträger fokussiert werden. Dadurch wird die Bildaufnahme mittels eines Objektivs mit einer hohen numerischen Apertur und nah am Abbe-Limit möglich. Eine weitere Schlüsseltechnologie ist die präzise Steuerung der Bildaufnahme und des Sortierens. Dazu verwendet das Gerät spezielle Algorithmen um Zellen im mikrofluidischen Chip zu verfolgen und ein field-programmable gate array (FPGA) zur akkuraten Steuerung der Fluoreszenz-Bildaufnahme. Die Bildanalyse ist über ein flexibles Programmierinterface integriert, welches die Erweiterung der Bildverarbeitung erlaubt. Außerdem wird eine grafische Benutzeroberfläche bereitgestellt, die die Zusammenstellung komplexer Graphen zur Bildanalyse ermöglicht. Das Gerät wurde unter Beachtung der open-source Grundsätze für Bio-Instrumente entwickelt. Diese können unter den Stichwörtern Funktionalität, Robustheit, Einfachheit, Modularität, Vergleichstests und Dokumentation zusammengefasst werden. Diese Leitlinien bieten die Grundlage für die weitere Entwicklung des Geräts und fördern die Zusammenarbeit innerhalb der open-source Gemeinschaft. Damit können die noch offenen Herausforderungen schneller gelöst werden. Dazu gehören die Optimierung der Zellbereitstellung mittels Mikrofluidik, die

Optimierung der Methodik zur Reduzierung der Bewegungsunschärfe aufgenommener Zellen und schließlich die Evaluierung des bereits in Hardware und Software integrierten Sortierverfahrens.